

На правах рукописи

Гольц Майя Львовна

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ТЕЧЕНИИ СОЧЕТАННОЙ
ВГС/ВИЧ ИНФЕКЦИИ И В ПРОЦЕССЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С**

14.01.09 – инфекционные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург, 2014

Диссертация выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор

Фазылов Вильдан Хайруллаевич

Официальные оппоненты:

Кузнецов Николай Ильич-доктор медицинских наук, профессор

ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, профессор кафедры инфекционных болезней

Степанова Елена Владимировна-доктор медицинских наук, профессор

СПб ГУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», заместитель главного врача по медицинской части

Ведущая организация: ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «___» 2014 г. в ____ час. на заседании диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12, зал заседаний ученого совета, 6 этаж)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова по адресу: Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук,

профессор

Александров Альберт Леонидович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вирусом гепатита С (ВГС) инфицированы примерно 180 миллионов, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) – около 40 миллионов человек во всем мире, в том числе 5 миллионов сочетанно инфицированы ВГС/ВИЧ (Kim A.Y., Chung R.T., 2009; Rotman Y., Liang T.J., 2009; Sherman K.E. et al., 2011). Вирусы гепатита С и ВИЧ имеют общие факторы риска, поэтому сочетанная инфекция ВГС/ВИЧ встречается у 60–80% потребителей инъекционных наркотиков и 16–25% пациентов с риском инфицирования половым путем (Vica I. et al., 2001; Sherman K.E. et al., 2002; Беляева Т.В. и соавт., 2002; Антонова Т.В. и соавт., 2005; Weber R. et al., 2006; Покровский В.И., 2010; Лиознов Д.А., 2010; Макарова И.В., 2011). Поскольку ВГС-ассоциированное заболевание печени прогрессирует быстрее при наличии ВИЧ, исследования показывают, что вирусный гепатит является наиболее вероятной не-СПИД-ассоциированной причиной смерти лиц, живущих с ВИЧ (Weber R. et al., 2006; Chen T.Y. et al., 2009; Кравченко А.В. и соавт., 2011).

Возможно, белки ВИЧ (tat, gp120) или сам ВИЧ напрямую меняет цитокиновую среду в печени через связывание или внедрение в гепатоциты, звездчатые клетки и резидентные иммунные клетки в печени (Tuyma A.C. et al., 2010). Кроме количественных изменений Т-клеток, ВИЧ может индуцировать качественные дефекты в иммунных ответах через нарушение профиля секреции цитокинов. Изменение цитокинового профиля ведет к нарушению функции НК-клеток, усугубляя течение ХГС (Khakoo S.I. et al., 2004; Iannello A. et al., 2008), отсюда сочетанная инфекция с ВИЧ является одним из наиболее частых факторов быстрого прогрессирования фиброза печени до цирроза (Покровский В.В., 2008; Thein H.H., 2008).

Вследствие более быстрого прогрессирования заболевания печени, плохой переносимости ВААРТ и высокого риска гепатотоксичности, лечение хронической ВГС-инфекции у пациентов сочетанной инфекцией является приоритетным (Labarga P. et al., 2010).

Цель исследования: оценить цитокиновый профиль пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией при естественном течении инфекционного процесса и на фоне противовирусной терапии ХГС.

Задачи исследования:

1. Изучить динамику отдельных цитокинов у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией при естественном течении инфекционного процесса в зависимости от вирусной нагрузки, функциональной активности клеточных факторов иммунитета и выраженности воспаления в сравнении с ВИЧ-моноинфекцией.

2. Определить особенности клинического течения и межклеточных взаимоотношений отдельных цитокинов в иммунном ответе на ранних сроках заболевания у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией при сравнительной характеристике с ВИЧ-моноинфекцией.

3. Оценить вирусологический ответ, клинико-ферментативную и морфологическую эффективность противовирусной терапии ХГС у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией и ВГС-моноинфекцией в сравнительном аспекте.

4. Выявить динамику ведущих цитокинов во взаимосвязи с клеточными факторами иммунного статуса пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией на фоне противовирусной терапии ХГС.

Научная новизна.

При естественном течении сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции и ВИЧ-моноинфекции определена сравнительная функциональная активность основных иммунокомпетентных клеток (CD4+, CD8+) с выработкой отдельных цитокинов; при сочетанной инфекции с высокой ВИЧ-нагрузкой установлено уменьшение числа CD4+ лимфоцитов, совпадающее со снижением уровня ИЛ-1 β и повышением – ИЛ-2, ИЛ-10, ИФН γ .

Впервые дана характеристика клинико-иммунологических особенностей сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции в сравнении с ВИЧ-моноинфекцией на ранних

сроках заболевания (до 1 года) при различных путях инфицирования; при парентеральном инфицировании установлено более агрессивное течение сочетанной инфекции ВГС/ВИЧ (с развитием саркомы Капоши, ВИЧ-энцефалопатии), сопровождающееся подавлением Т-хелперного звена и активацией цитотоксического звена иммунного ответа.

Определены предикторы эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С при сочетанной инфекции с ВИЧ на основе цитокинового профиля, отражающие формирование стойкого вирусологического ответа.

Практическая значимость.

1. Расширены показатели иммунологического мониторинга в рамках диспансерного наблюдения за пациентами сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией с включением отдельных цитокинов для прогнозирования адекватного иммунного ответа при естественном течении инфекции и проведении противовирусной терапии ХГС.

2. Представлено клинико-лабораторное обоснование эффективности ПВТ ХГС при сочетанной инфекции с ВИЧ с учетом прогностических критериев стойкого вирусологического ответа (СВО).

Внедрение результатов исследования. Рекомендации по определению отдельных цитокинов в мониторинге ПВТ ХГС у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией внедрены в практику работы врачей Республиканского Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ (РЦПБ СПИД), Республиканской клинической инфекционной больницы (РКИБ) и учебный процесс кафедры инфекционных болезней Казанского государственного медицинского университета.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (СПб.2009, 2011), XV, XVI, XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань,

2009, 2010, 2011, 2012, 2014), представлены на Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 85-летию кафедры инфекционных болезней КГМУ (Казань, 2010), 8-й Северо-Западной научной гастроэнтерологической сессии (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской межвузовской научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной 80-летию медико-профилактического факультета (Казань, 2011), XVI, XIX Российском конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2011, 2014), 14-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург-Гастро-2012» (СПб., 2012), II Международном конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Астана, 2012), II, III, IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (М., 2010, 2011, 2012); 88-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 200-летию Казанского государственного медицинского университета (Казань, 2014); VI Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 14 научных работ, в том числе 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сочетанная ВГС/ВИЧ инфекция при естественном течении характеризуется выраженным по сравнению с ВИЧ-моноинфекцией дисбалансом в иммунном ответе: снижением числа CD4-клеток с активацией CD8-лимфоцитов, а прогрессирование сопровождается нарастанием уровней ИФН γ и ИЛ-2, снижением уровня ИЛ-1 β .

2. ВИЧ-инфекция на ранних сроках характеризуется повышением ИФН γ и ИЛ-1 β , при прогрессировании заболевания – их снижением и нарастанием уровней ИЛ-10 при снижении числа CD4 клеток; сочетанная ВГС/ВИЧ инфекция по сравнению с показателями ВИЧ-моноинфицированных пациентов

ассоциирована с ранним снижением ИЛ-1 β на фоне выраженного угнетения Т-клеточного звена иммунитета и активации цитотоксических клеток.

3. Сочетанная ВГС/ВИЧ инфекция при естественном течении приводит к более агрессивному течению и быстрому прогрессированию иммунодефицита с развитием СПИД-маркерных заболеваний (пнеумоцистная пневмония, саркома Капоши, ВИЧ-энцефалопатия) по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными пациентами, особенно на ранних сроках заболевания.

4. Противовирусная терапия ХГС у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией оказывает положительное влияние в отношении активных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4 $^{+}$ -, CD8 $^{+}$ -клеток), с разнонаправленностью изменения уровней ведущих цитокинов (повышением уровня ИФН γ и ИЛ-10, снижением ИЛ-1 β), что в совокупности способствует снижению уровня РНК-ВИЧ и достижению стойкого вирусологического ответа по ВГС-инфекции.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Автор участвовал в разработке дизайна исследования, лечебно-диагностическом процессе, сборе и анализе полученных клинико-лабораторных данных с формированием электронной базы. Автором проведена математико-статистическая обработка и обобщение полученных результатов, формулирование основных положений диссертации и оформление диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана на русском языке, изложена на 152 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, обсуждения результатов, практических рекомендаций, списка литературы (89 – отечественных, 144 – иностранных источника). Работа иллюстрирована 41 таблицей и 25 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в период 2010-2013 г.г. на клинической базе кафедры инфекционных болезней Казанского государственного медицинского университета (КГМУ) - Республиканской клинической инфекционной больницы (РКИБ) им. А.Ф. Агафонова г. Казани; диспансерное наблюдение за

пациентами с клинико-лабораторным мониторингом проводилось в Республиканском центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ Республики Татарстан (РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ)*.

Общая клиническая характеристика: под наблюдением находились 232 пациента, в т.ч. 102 – с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией в возрасте $32,77 \pm 0,59$ лет (81% мужчин, 19% женщин) с длительностью инфицирования ВИЧ $5,77 \pm 0,36$ лет, 49 – с ВИЧ-моноинфекцией в возрасте $37,8 \pm 1,61$ лет (45% мужчин, 55% женщин) с длительностью инфицирования ВИЧ $2,85 \pm 0,18$ лет и 81 – с ВГС-моноинфекцией в возрасте $33,8 \pm 1,16$ лет (71% мужчин, 29% женщин) с длительностью инфицирования ВГС $5,79 \pm 0,55$ лет. По стадиям ВИЧ-инфекции (классификация В.И. Покровского, 2006) пациенты этих двух групп разделились следующим образом: в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции – III стадия – 60 (59%), IVA – 27 (26%), IVB – 15 (15%); в группе ВИЧ-моноинфекции: III стадия – 37 (75%), IVA – 9 (18%), IVB – 3 (7%). В группе сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекции преобладали пациенты (51%) со средней (10 тыс.-100 тыс.коп/мл) вирусной нагрузкой ВИЧ и уровнем CD4+клеток более 500/мкл (51%). Вирусная нагрузка ВГС в данной группе была высокой (более 400 тыс. МЕ/мл) у 80% пациентов, 45% имели генотип 3a, 43% - генотип 1(a,b); уровни АлАТ не превышали 5 норм у 82% пациентов.

Группа ВИЧ-моноинфекции характеризовалась высоким уровнем CD4+клеток (более 500/мкл) у 45% пациентов, низкая (до 10 тыс. коп/мкл) и средняя вирусная нагрузка ВИЧ встречались с одинаковой частотой 41%.

Клиническая картина у пациентов в III стадии ВИЧ в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции определялась сопутствующей ВГС-инфекцией и проявля-

* Клинико-диагностические исследования на базе РКИБ и РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ проводились при участии зав. отделением медико-социальной реабилитации, канд. мед. наук Бешимова А.Т. и ассистента кафедры инфекционных болезней КГМУ, канд. мед. наук Манаповой Э.Р.

лась астеновегетативным синдромом - у 19,5%; диспепсическим синдромом - у 28,2% пациентов. У пациентов IV стадии в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции, кроме вышеуказанных симптомов в 11,1% и 22,2% случаев, наблюдались проявления ВИЧ-инфекции в виде кандидозного поражения кожи и слизистых оболочек у 3 (2,9%) пациентов этой группы. Основным клиническим признаком у пациентов ВИЧ-моноинфекцией при первичной диагностике был астеновегетативный синдром – у 11,1% пациентов. Лимфаденопатия регистрировалась у 11,1% пациентов, у 2 (4,1%) пациентов III стадии ВИЧ в данной группе выявлена персистирующая генерализованная лимфаденопатия. У пациентов IV стадии ВИЧ наблюдались кандидозные поражения кожи и слизистых оболочек – у 5 (10,2%) пациентов.

Среди сопутствующих заболеваний, регистрируемых в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции, преобладали наркозависимость (77,4%), ЗППП – у 34,9% пациентов, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта – в 20,6% случаев, а у ВИЧ-моноинфицированных – у 22,4%, 21,6% и 21,6% соответственно.

В группе ВГС-моноинфекции преобладали случаи, вызванные вирусом генотипа 1 (58%) с низкой вирусной нагрузкой ВГС (54%), уровнем АЛАТ до 5 норм (68%) и клиническими проявлениями поражения ЖКТ (20,9%), гепатобилиарной системы (61,6%).

Методы исследования. Клинико-эпидемиологическую диагностику ВИЧ- и ВГС-инфекции проводили на основании санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции», санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.958-00 «Профилактика вирусных гепатитов. Общие требования к эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами», утвержденных МЗ РФ 1 января 2000 года, методических рекомендаций Минздравсоцразвития РФ «О проведении обследования на ВИЧ-инфекцию» от 06.08.2007 г. № 5950-РХ.

Исследования периферической крови проводили на гематологическом

анализаторе BC – 3000 Plus (Mindray Co., LTD, Китай).

Биохимические исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе FURUNO CA-180 (FURUNO ELECTRIC CO., LTD, Япония) с использованием стандартизованных реагентов для определения активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), общего белка, мочевины, креатинина, холестерина, общего и прямого билирубина.

Фенотипирование лимфоцитов проводилось методом прямой реакции иммунофлуоресценции с мкАТ фирмы «Becton Dickinson» (США). Использовали BD Мультитест 6-цветный TBNK реагент, содержащий мкАТ CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19 с учетом реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson, USA).

Определение концентраций ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, ИФН γ в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием наборов реагентов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) при первичном обнаружении антител к ВИЧ в ИФА. Измерение оптической плотности раствора в лунках и расчет концентраций цитокинов в исследуемых образцах выполняли на микропланшетном фотометре Thermo Scientific Multiskan EX (США).

Выявление антител к ВИЧ (суммарные антитела) и ВГС (IgM, IgG) проводили методом ИФА с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» г. Н. Новгород. Для подтверждения наличия антител к ВИЧ, выявленных в ИФА, проводили исследование методом иммунного блота с использованием тест-систем «New LAV Blot I», BioRad (Франция) в соответствии с прилагаемыми к тест-системам инструкциями.

Определение РНК-ВГС (с генотипированием) и РНК-ВИЧ в плазме периферической крови проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени на анализаторах COBAS TaqMan 48 (Hoffman-La-Roche, Швейцария), Abbott

m2000rt (Abbott Biosystems, США).

Чувствительность качественного метода ПЦР для обнаружения РНК-ВГС – 150 МЕ/мл, количественного – 15 МЕ/мл; для определения РНК-ВИЧ порог составил 150 коп/мл.

Проводилась инструментальная диагностика: эластометрия печени с помощью аппарата «Фиброскан» (FibroScan) (EchoSens, Франция) и УЗИ-исследование органов брюшной полости по общепринятым методам.

Математическую обработку статистических данных проводили с помощью пакета программ «Microsoft Excel 2007». Использовали параметрические методы оценки результатов – вычисление средней арифметической (M), средней ошибки средней арифметической (m). Оценка различия между сопоставляемыми группами по избранным критериям осуществлялась по t -критерию Стьюдента. Достоверность изменений признавалась при вероятности ошибки $p \leq 0,05$. Проводился корреляционный анализ с использованием коэффициента линейной корреляции Пирсона (Гланц С., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты первичного иммунологического обследования пациентов в группах естественного течения – сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции и ВИЧ-моноинфекции не показали достоверных различий между группами. В динамике наблюдения с 6 месяца начали выявляться различия в изучаемых показателях между группами: сниженные ($p < 0,01$) относительные показатели CD4+-клеток, повышенные относительные уровни CD8+-клеток ($p < 0,05$) и соответственно уровни иммунорегуляторного индекса (ИРИ) ($p < 0,01$) у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными.

Эти результаты согласуются с данными о механизмах негативного влияния хронической ВГС-инфекции на уровни CD4+-клеток, включающих продолжающуюся хроническую Т-клеточную активацию вследствие ВГС-

инфекции даже при стойком подавлении ВИЧ на ВААРТ, что может ограничить иммунологический ответ. Другие механизмы связаны с прямым инфицированием CD4+-клеток лимфотропным ВГС. РНК ВГС была обнаружена в CD4+- и CD8+- клетках, а также в моноцитах, что может привести к прямым взаимодействиям вирусов, влияющих на динамику и восстановление CD4+-клеток (Hershow R. et al., 2005; Kovacs A. et al., 2010; Potter M. et al., 2010).

Динамика клеточных факторов при естественном течении сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции (n=32) при сравнительной характеристике с ВИЧ-моноинфекцией (n=30) сопровождалась достоверными ($p<0,01$) изменениями в экспрессии цитокинов при различных уровнях CD4+-клеток и ВИЧ-нагрузки. Так, если при числе CD4+-лимфоцитов >500 кл/мкл уровень ИЛ-1 β повышался у пациентов обеих сравниваемых групп – ($126,75\pm 41,23$ пкг/мл и $129,73\pm 37,10$ при норме $41,7\pm 16,4$ пкг/мл; $p<0,01$) без достоверных ($p>0,05$) различий, то при числе CD4+-клеток <500 кл/мкл имела место индукция экспрессии ИЛ-1 β только у ВИЧ-моноинфицированных пациентов ($108,88\pm 52,59$ пкг/мл; $p<0,01$).

Уровень ИФН γ при высоких показателях CD4+-клеток был повышен: $54,08\pm 21,05$ пкг/мл при норме $35,7\pm 7,2$ пкг/мл; $p<0,01$ в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции, $180,62\pm 67,48$ пкг/мл; $p<0,01$ – в группе ВИЧ-моноинфекции, различия между группами достоверны ($p<0,01$). При числе CD4+-клеток <500 кл/мкл экспрессия ИФН γ достоверно снижалась – $44,84\pm 22,48$ пкг/мл и $109,61\pm 37,03$ пкг/мл; $p<0,01$, с сохранением достоверных различий между группами ($p<0,01$).

При исследовании уровня ИЛ-10 было выявлено его достоверное повышение у ВИЧ-моноинфицированных пациентов со средним и высоким уровнем CD4+-клеток по сравнению с показателями в соответствующих группах пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией в 4,6 ($p<0,01$) и 2,1 раза ($p<0,01$). Уровни ИЛ-2 были повышены соответственно в 1,2 ($p<0,01$) и 1,3 раза ($p<0,01$) в группах пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией и ВИЧ-моноинфекцией с уровнем

CD4-клеток более 500 кл/мкл; в 1,15 ($p<0,05$) и 1,45 раза ($p<0,05$) – в группах с числом 350-500 кл/мкл без достоверных различий между группами.

При низкой ВИЧ-нагрузке уровень ИЛ-1 β повышался ($127,99\pm 37,81$ пкг/мл; $p<0,01$) и ($100,25\pm 31,32$ пкг/мл, $p<0,01$) соответственно в группах сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции и ВИЧ-моноинфекции, с достоверными различиями между группами ($p<0,01$), при средней – повышался у ВИЧ-моноинфицированных пациентов ($p<0,01$), а при высокой достоверно снижался ($0,38\pm 0,18$ пкг/мл; $p<0,001$ и $0,16\pm 0,01$ пкг/мл; $p<0,001$) соответственно без значимых различий между группами. Концентрации ИФН γ были повышены у пациентов в группе ВИЧ-моноинфекции при низкой, средней и высокой вирусной нагрузке – ($151,66\pm 57,98$ пкг/мл; $p<0,01$), ($70,18\pm 19,23$ пкг/мл; $p<0,01$) и ($184,75\pm 47,90$ пкг/мл; $p<0,01$) соответственно. У пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией повышенный уровень ИФН γ отмечался в группах со средней – ($p<0,01$) и высокой ($p<0,01$) ВИЧ-нагрузкой.

При низкой и средней ВИЧ-нагрузке уровни ИЛ-10 были достоверно выше у ВИЧ-моноинфицированных пациентов по сравнению с показателями группы сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции – ($12,82\pm 4,72$ пкг/мл и $15,15\pm 5,09$ пкг/мл; $p<0,05$) и ($10,70\pm 1,59$ и $17,90\pm 2,22$ пкг/мл; $p<0,01$) соответственно. Показатели ИЛ-2 у пациентов в группе ВИЧ-моноинфекции были повышены: ($33,54\pm 12,06$ пкг/мл при норме $26,9\pm 8,8$ пкг/мл; $p<0,05$) при низкой, ($41,39\pm 6,58$ пкг/мл; $p<0,01$) при средней и ($33,13\pm 8,39$ пкг/мл; $p<0,05$) при высокой ВИЧ-нагрузке, а у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией – ($33,94\pm 6,07$ пкг/мл; $p<0,01$) и ($86,67\pm 48,32$ пкг/мл; $p<0,05$) при средней и высокой вирусной нагрузке соответственно.

Снижение ИЛ-1 β , повышение уровней ИФН γ и ИЛ-10, более выраженное у моноинфицированных пациентов при сохранных уровнях CD4+-клеток и невысокой вирусной нагрузке ВИЧ, может отражать переключение иммунного ответа на Th2-тип реагирования. В ряде работ показано, что при хронизации ВГС-инфекции, ВИЧ-инфекции наблюдаются слабый CD4+-Т-клеточный ответ

и преобладание количества Th2 и продуцируемых ими цитокинов (Clerici M. et al., 1993; Graziosi C., 1994; Fust G. et al., 1995; Navikas V. et al., 1995; Wedemeyer H., 2003; Accapezzato D. et al., 2004).

Результаты клинического обследования пациентов на ранних сроках инфицирования (менее 1 года) показали более агрессивное течение в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции при парентеральном пути инфицирования (n=25): развивались саркома Капоши (4%), ВИЧ-энцефалопатия (4%) и через 2 года в этой группе не было ни одного больного без каких-либо клинических проявлений. В группе ВИЧ-моноинфекции (n=20) при половом пути инфицирования на этих же сроках наблюдения у 36% пациентов по-прежнему не было клинических проявлений. Ранее было показано, что пути заражения влияют на клинико-иммунологические особенности течения ВИЧ-инфекции, частоту и время поражения вторичными заболеваниями (Романенко О.М. и др., 2004). В нашем исследовании у пациентов в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции уже через шесть месяцев наблюдались более низкие показатели CD4+-клеток ($0,36 \pm 0,05$ кл/мкл; $p < 0,01$), а через один год наблюдения уровни CD4+-клеток были в 2 раза ($p < 0,001$), CD8+-лимфоцитов - в 2,4 раза ($p < 0,001$) ниже в этой группе по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными, с сохранением этой тенденции в динамике. Изменения в цитокиновом профиле отражали переключение иммунного ответа на Th2-тип: в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции выявлено повышение ИФН γ независимо от уровня CD4+клеток ($p < 0,01$), увеличение синтеза провоспалительного цитокина ИЛ-1 β при сохраненных в норме показателях CD4+-клеток ($375,87 \pm 115,86$ пкг/мл; $p < 0,01$), но уже при уровне CD4+ < 500 кл/мкл наблюдалась супрессия данного цитокина ($p < 0,01$); при снижении числа CD4+-клеток нарастали концентрации ИЛ-10 – так, при CD4+ < 350 кл/мкл его уровни – $23,83 \pm 7,15$ пкг/мкл при норме $13,1 \pm 7,4$ пкг/мл; $p < 0,01$. У ВИЧ-моноинфицированных наблюдалась повышенная экспрессия всех цитокинов независимо от числа CD4+ клеток кроме ИЛ-2, который был низким при CD4+ < 350 кл/мкл ($10,61 \pm 7,47$ пкг/мл;

$p < 0,05$). Дефицит ИЛ-2 нарастал с прогрессированием заболевания и ассоциировался со снижением числа CD4+-лимфоцитов. По нашему мнению, особенностью раннего инфицирования можно считать повышенные уровни ИФН γ при различных показателях CD4+-лимфоцитов, а также сохранные уровни ИЛ-2, что может отражать неглубокие изменения в регуляции иммунного ответа на начальных сроках заболевания.

Результаты корреляционного анализа показали, что уровни ИФН γ имеют прямую зависимость от уровня CD4-клеток ($r=0,86$; $p < 0,001$) и обратную – от вирусной нагрузки ВИЧ ($r=-0,38$; $p < 0,01$). Это закономерно, поскольку Th1-лимфоциты являются продуцентами данного цитокина (Ройт А., 2000; Freeman A.J. et al., 2001; Радченко В.Г., 2004). ИЛ-10, напротив, имел прямую зависимость от ВИЧ-нагрузки ($r=0,72$; $p < 0,001$), и обратную – от уровня CD4-клеток ($r=-0,72$; $p < 0,001$). Поскольку ИЛ-10 – типичный противовоспалительный цитокин, ингибирующий продукцию ИФН- γ , ИЛ-2 и весь Th1-ответ, но повышающий активность Th2-типа, является логичным, что его уровни повышаются при угнетении клеточного иммунитета (Ярилин А.А., 1999; Ройт А., 2000). ИЛ-2, как Т-клеточный ростовой фактор, имел обратную зависимость от уровня CD4-клеток ($r=-0,98$; $p < 0,001$), что отражает механизм обратной связи, регулирующий синтез данного иммуномодулятора.

Динамика АлАТ в сыворотке крови пациентов ВГС/ВИЧ инфекцией в зависимости от уровня ВИЧ-нагрузки показала повышенную активность данного фермента на всех сроках наблюдения. Если его исходные показатели в начале наблюдения в группе с низкой вирусемией были $66,06 \pm 9,26$ ед/л при средней норме $23,62 \pm 1,01$ ед/л; $p < 0,001$, средней – $86,72 \pm 11,09$ ед/л; $p < 0,001$, высокой – $39,95 \pm 3,00$ ед/л, то динамика наблюдения была волнообразной, не достигая уровня здоровых лиц. Так, к 36 мес. наблюдения у пациентов с исходно низкой вирусемией уровни АлАТ регистрировались $76,61 \pm 17,92$ ед/л; $p < 0,01$, средней – $60,52 \pm 25,72$ ед/л; $p < 0,01$, высокой – $50,30 \pm 20,91$ ед/л; $p < 0,01$. При исследовании уровней АлАТ в зависимости от вирусемии ВГС выявлено, что

низкая ВГС-нагрузка сопровождается достоверно более низкими показателями АлАТ ($79,48 \pm 9,15$ ед/л и $31,45 \pm 10,64$ ед/л; $p < 0,001$).

Это подтверждает данные о том, что сочетанная ВГС/ВИЧ инфекция сопровождается более активным некрвоспалительным процессом в печени, возможно более высокими уровнями виремии ВГС (Hernandez M.D., Sherman K.E., 2011; Макарова И.В., 2009), причем данный эффект, по-видимому, не зависит от активности ВИЧ-инфекции, так как не связан с концентрацией ВИЧ в крови.

Для решения задач по эффективности противовирусной терапии (ПВТ) ХГС в исследование были включены 140 пациентов, разделенных на группы: моноинфекции ВГС – 81 пациент в возрасте $33,8 \pm 1,16$ года и сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции – 59 пациентов в возрасте $31,9 \pm 0,76$ лет. Группы были сопоставимы по возрастно-половой структуре, длительности инфицирования, активности инфекционного процесса (ВГС-нагрузка), генотипам ВГС и воспалительным маркерам (АлАТ, степень фиброза). Пациенты получали ПВТ ХГС препаратами пегилированного интерферона- α (2а) в дозе 180 мкг подкожно еженедельно в комбинации с рибавирином, дозированным по массе тела (800-1200 мг/сутки). Длительность курса лечения: 48 недель для ВГС-моноинфицированных пациентов с генотипами 1а, 1в и пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией, 24 недели для ВГС-моноинфицированных пациентов с не 1 генотипом. Клинико-лабораторный мониторинг ПВТ проводился на сроках до лечения, 4 (БВО), 12 (РВО), 24, 48 (ВО) недель терапии, а также через 4 и 24 (СВО) недели после окончания лечения.

В группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции РВО был получен у 82% пациентов с 1 генотипом и 96% пациентов с не 1 генотипом, что позволило получить стойкий вирусологический ответ (СВО) у 65% и 96% пациентов соответственно. В группе ВГС-моноинфекции РВО наблюдался у 68 (84%) пациентов, а стойкий вирусологический ответ достигнут у 74 (91%) пациентов.

Результаты ПВТ ХГС в обеих группах показали нормализацию АлАТ уже к концу 4 недели наблюдения у 112 (80%) пациентов, с достижением уровня здоровых лиц у остальных пациентов к 24 неделе наблюдения, также было отмечено улучшение морфологического состояния печени в обеих группах. Так, после лечения ни в одной из исследуемых групп не было пациентов с фиброзом 3 по METAVIR (до лечения таких пациентов было 4); подавляющее число пациентов после терапии ХГС имели фиброз 0 (79,2% пациентов сочетанной инфекцией и 90,6% пациентов моноинфекцией). Эти данные подтверждают антифибротический эффект ПВТ ХГС, показанный в ранее проведенных исследованиях (Романова Е.Б. и др., 2005; Гусев Д.А., 2007).

Изменения цитокинов у пациентов, ответивших на ПВТ ХГС, в обеих группах были сходными: снижение исходно повышенных уровней ИЛ-1 β , повышение исходно низких уровней ИФН γ и ИЛ-10, нормализация высоких уровней ИЛ-2.

У 13% пациентов группы сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции и 9% пациентов группы ВГС-моноинфекции не были достигнуты РВО и СВО («неответчики»).

Исследование клеточных факторов иммунитета пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией в зависимости от ответа на терапию выявило достоверно более низкие исходные абсолютные показатели CD4+ клеток - ($0,44 \pm 0,03$ кл/мкл; $p < 0,01$), что сопровождалось снижением ИРИ ($0,44 \pm 0,08$; $p < 0,01$) у «неответчиков» по сравнению с «ответчиками». Кроме того, у «неответчиков» были ниже исходные показатели В-лимфоцитов ($0,08 \pm 0,02$ кл/мкл; $p < 0,01$). На фоне терапии сохранялась тенденция снижения ИРИ, CD4+-лимфоцитов, более высоких значений CD8+-клеток на фоне терапии и в периоде наблюдения.

Цитокиновый профиль у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией, не ответивших на ПВТ, отражал изменения клеточного иммунитета и характеризовался исходно более низкими уровнями всех исследуемых цитокинов (ИФН γ - $0,16 \pm 0,01$ пкг/мл, ИЛ-1 β - $31,86 \pm 5,65$ пкг/мл, ИЛ-10 - $5,29 \pm 1,49$ пкг/мл), которые оставались монотонно низкими на различных сроках

лечения и наблюдения. Отсутствие динамики концентраций цитокинов на фоне ПВТ у данных пациентов может свидетельствовать о глубоком истощении клеточного иммунитета, когда организм в состоянии обеспечить только базальный уровень секреции эндогенных иммуномодуляторов.

В иммунном статусе ВГС-моноинфицированных пациентов, не ответивших на терапию, наблюдались значимые изменения клеточного иммунного звена по сравнению с «ответчиками» – снижение уровней CD8+ клеток ($p < 0,01$), абсолютных и относительных показателей NK-клеток: ($p < 0,001$) и ($p < 0,01$) соответственно. Изменения цитокинового статуса у этих пациентов характеризовались более ранним и выраженным снижением ИЛ-1 β ($10,64 \pm 5,01$ пкг/мл уже на 48 неделе лечения, что в 2 раза ниже показателей «ответчиков» на этом сроке), повышением уровней ИЛ-10 ($79,14 \pm 38,95$ пкг/мл), ИФН γ ($550,95 \pm 189,50$ пкг/мл). Вероятно, гиперактивная реакция на инфекционный агент с неадекватным выбросом цитокинов не позволила данной группе пациентов ответить на ПВТ.

В нашем исследовании показано достоверное повышение процентного содержания CD4+-клеток в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции на фоне терапии ХГС по сравнению с исходными уровнями. Подобная динамика в совокупности с изменениями цитокинов может свидетельствовать о сдвиге клонов Т-хелперов в сторону 1-го субкласса, опосредующего противовирусный эффект, что позволяет сделать вывод о достоверном иммуномодулирующем эффекте ПВТ ХГС в отношении активных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+).

Частота развития нежелательных явлений в группе сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции составила $32,49 \pm 8,21\%$ случаев, в группе ВИЧ-моноинфекции – $37,89 \pm 6,85\%$ случаев ($p > 0,05$). Среди побочных реакций наиболее часто имели место астеновегетативный синдром у 33,9% пациентов в группе ВГС/ВИЧ-сочетанной инфекции и у 58% ВГС-моноинфицированных пациентов, гриппоподобный синдром - у 22% и 35,8%, кожные реакции - у 33,8% и 43,1%

и изменения со стороны центральной нервной системы - у 22% и 30,8% соответственно.

Реакция периферической крови на ПВТ носила классический характер: лейкопения наблюдалась у 81%, в т.ч. нейтропения – у 75%, тромбоцитопения – у 91%, анемия – у 42% пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией и соответственно у 76%-53%-62%-66% ВГС-моноинфицированных пациентов. Все нежелательные явления были легкой или средней тяжести и не требовали отмены терапии, полностью восстанавливались к 24 неделям наблюдения.

Таким образом, при клинико-патогенетическом обосновании участия цитокинов в иммунном ответе при естественном течении сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции наблюдается переключение иммунного ответа на Th2-тип реагирования с изменением профиля продуцируемых цитокинов (снижение ИЛ-1 β , нарастание ИЛ-10). ПВТ ХГС привела к повышению уровня ИФН γ и ИЛ-10, снижению ИЛ-1 β на фоне достоверного повышения числа CD4 клеток и снижения активации CD8 клеток, что может свидетельствовать о сдвиге клонов Т-хелперов в сторону 1-го субкласса, опосредующего противовирусный эффект, достоверно отмеченный в отношении снижения РНК ВИЧ и достижения СВО на ПВТ ХГС.

ВЫВОДЫ

1. Естественное течение сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции в сравнении с ВИЧ-моноинфекцией характеризуется более выраженной дисфункцией Т-лимфоцитов (снижение CD3, подавление CD4 с активацией CD8), увеличением ИФН γ и ИЛ-2 на фоне снижения ИЛ-1 β - раннего показателя прогрессирования иммуносупрессии в обеих сравниваемых группах.

2. У всех пациентов с ВИЧ-инфекцией на ранних сроках инфицирования отмечается повышение ИФН γ и ИЛ-1 β , при дальнейшем прогрессировании болезни их снижение с увеличением уровня ИЛ-10 на фоне подавления CD4 клеток; при этом у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией наблюдается

более значительное подавление Т-клеточного звена иммунитета с активацией цитотоксических клеток.

3. Иммунная дисфункция с участием отдельных цитокинов определяет более агрессивное клиническое течение сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции по сравнению с ВИЧ-моноинфекцией, характеризуется более ранним развитием тяжелых СПИД-индикаторных заболеваний (ВИЧ-энцефалопатия, саркома Капоши, пневмоцистная пневмония).

4. Комбинированная противовирусная терапия ХГС (пегинтерферон и рибавирин) при сочетанной ВГС/ВИЧ инфекции в течение 48 недель способствовала купированию воспалительного процесса с достижением стойкого вирусологического ответа у 65% пациентов с ВГС генотипа 1 и 96% - с ВГС генотипа не 1, достоверно не отличаясь от эффективности у ВГС-моноинфицированных.

5. При достижении стойкого противовирусного ответа у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией выявлено иммунокорректирующее действие ПВТ ХГС в субпопуляциях Т-лимфоцитов (CD4⁺-, CD8⁺-клеток), с повышением уровня ИФН γ и ИЛ-10, снижением ИЛ-1 β , что в совокупности способствует снижению уровня РНК-ВИЧ и РНК-ВГС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для разработки индивидуального мониторинга пациентов ВИЧ-инфекцией с целью прогнозирования тяжести инфекционного процесса и программы лечения оппортунистических и сопутствующих заболеваний, в т.ч. ПВТ ХГС, рекомендуется определение цитокинов (ИЛ-1 β , ИФН γ , ИЛ-10) как метода уточнения функциональной активности иммунокомпетентных клеток (макрофаги, лимфоциты, в т.ч. их активные субпопуляции) в комплексе иммунологического обследования каждые 3-6 месяцев наблюдения.

2. С целью выявления ранних иммунологических предикторов стойкого вирусологического ответа на ПВТ ХГС является целесообразным включение маркеров формирования специфического иммунного ответа - ИЛ-1 β , ИФН γ - с

учетом активности CD4+, CD8+ клеток в комплекс мониторинга ПВТ ХГС у пациентов сочетанной ВГС/ВИЧ инфекцией на сроках: до лечения, 4, 24, 48 недель лечения, 4 и 24 недели наблюдения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л. Динамика показателей цитокинового и иммунного статуса у больных хроническим вирусным гепатитом С при проведении комбинированной анти-НСV терапии // Журнал инфектологии. – 2010. – Том 2. – №4. – С. 120.

2. Фазылов В.Х., Мустафин И.Г., Манапова Э.Р., Бешимов А.Т., Гольц М.Л. Цитокиновый статус у больных хроническим вирусным гепатитом С при проведении комбинированной анти-НСV терапии // Инфекционные болезни. – 2010. – Том 8. – Приложение №1. – С.334-335.

3. Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Цитокиновый статус на ранних сроках инфицирования ВИЧ // Научная конференция молодых ученых «Актуальные вопросы инфекционной патологии-2011», Санкт-Петербург, тезисы докладов. – 2011. – С.21.

4. Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Изучение цитокинов в крови на ранних сроках инфицирования вирусом иммунодефицита человека // Инфекционные болезни. – 2011. – Том 9. – Приложение №1. – С. 228.

5. Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Цитокиновый статус у больных хроническим гепатитом С и коинфекцией гепатитом С и вирусом иммунодефицита человека при проведении комбинированной противовирусной терапии // Инфекционные болезни. – 2011. – Том 9. – Приложение №1. – С. 228-229.

6. Гольц М.Л., Манапова Э.Р., Бешимов А.Т. Динамика показателей цитокинового статуса у больных ХГС и коинфекцией ХГС/ВИЧ при проведении комбинированной противовирусной терапии // Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине», Казань. – 2011. – С.49.

7. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л. Ранний вирусологический ответ и отсутствие НCV-РНК в ПЦР на 12 неделе наблюдения после комбинированной терапии хронического гепатита С как предикторы стойкого вирусологического ответа у пациентов с ХГС // Журнал инфектологии. – 2012. – Том 4. – №3. – С. 71-72.

8. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Динамика цитокинового профиля у коинфицированных ХГС/ВИЧ пациентов при проведении комбинированной противовирусной терапии ХГС // Материалы 14-го Международного Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург-Гастро-2012»/Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – №2-3. – С.94.

9. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Цитокиновый профиль пациентов на ранних сроках инфицирования вирусом иммунодефицита человека // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Том 6 (14). – №3 (1). – С. 150-152.

10. Фазылов В.Х., Ткачева С.В., Манапова Э.Р., Гольц М.Л. Опыт применения цитокиновых препаратов в комплексной противовирусной терапии хронического гепатита С // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Том 6 (14). – №3 (1). – С. 152-154.

11. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Цитокины как маркеры функциональной активности иммунокомпетентных клеток у ВГС/ВИЧ пациентов при проведении комбинированной противовирусной терапии ХГС // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Том 4. – №4. – С.52-57.

12. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т., Люстикман Э.М. Опыт клинической диагностики ВИЧ-инфекции в условиях профильного стационара // Казанский медицинский журнал. – 2013. - Том 94. – №1. – С.30-34.

13. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Клинико-иммунологический и цитокиновый профиль у пациентов ВИЧ-инфекцией на ранних сроках заболевания при различных путях инфицирования // Цитокины и воспаление. – 2013. – Том 12. – № 3. – С. 35-40.

14. Гольц М.Л., Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Бешимов А.Т. Цитокиновый статус у больных хроническим вирусным гепатитом С при проведении комбинированной анти-НСV терапии // Цитокины и воспаление. – 2013. – № 4. – С.25-29.

Список сокращений

- АлАТ – аланинаминотрансфераза
БВО – быстрый вирусологический ответ
ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия
ВГС – вирус гепатита С
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ЗППП – заболевания передаваемые половым путем
ИФА – иммуноферментный анализ
ИРИ – иммунорегуляторный индекс
ИФН – интерферон
ИЛ – интерлейкин
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПВТ – противовирусная терапия
ПегИФН – пегилированный интерферон
РВО – ранний вирусологический ответ
РНК – рибонуклеиновая кислота
СВО – стойкий вирусологический ответ
СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
УЗИ – ультразвуковое исследование
ХГС – хронический гепатит С
CD4 – маркер Т-хелперов
CD8 – маркер цитотоксических Т-лимфоцитов
Th1 – Т-хелперы 1-го типа
Th2 – Т-хелперы 2-го типа